

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17636

研究課題名(和文) 心筋特異的多蛍光発色マウスを用いた内因性心筋分裂促進因子の探索と治療応用

研究課題名(英文) Exploration of endogenous cardiac mitogenic factors using myocardial-specific multi-rflourescent mice and their therapeutic application

研究代表者

神田 真人 (Kanda, Masato)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50444055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新しい細胞移植療法を開発し、マウスモデルを用いた新規の再生促進因子探索のための手法を確立することを目的とした。心筋特異的多蛍光発色マウスモデル(Rainbow-Cre マウス)を用いて、心筋梗塞後の慢性期に、蛍光発色心筋のクローン増殖により、梗塞周囲領域で再生頻度が増加していることを確認した。そして、バイオマテリアルによる生着性を高めた褐色脂肪組織(BAT)細胞の移植療法を開発し、心臓のリモデリングを抑制し、心機能を保持している傾向を確認できた。これらにより、心筋梗塞に対して、あたらしい移植療法を確立できたと同時に、細胞移植時に増殖促進部位を特異的に捕らえる手技を確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓移植以外に根本的な治療法は見つからない慢性心筋梗塞およびそれに伴う心不全に対して、心機能を回復させる根本的治療としての再生医療の開発を目指し、拒絶反応が起こりにくい、細胞定着率の高い新しい手法を確立することができた。そして、移植治療に伴う、残存心筋由来の心筋再生頻度を正確に評価でき、増殖部位からのサンプル採取が可能なモデルを開発できたことで、新規再生促進物質を探索し、新規治療の開発につながっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a new cell transplantation therapy for myocardial infarction, and to develop a mouse model that can detect the site of myocardial regeneration by the therapy, thereby establishing a method for the search for novel regeneration-promoting factors. Using a myocardial-specific multi-fluorescent mouse model (Rainbow-Cre mouse), we confirmed that the frequency of regeneration increased in the peri-infarct region by clonal proliferation of fluorescent myocardium in the chronic phase after myocardial infarction. Then, we developed a transplantation therapy of brown adipose tissue (BAT) cells with enhanced viability by biomaterials, and were able to confirm the trend of suppressing cardiac remodeling and preserving cardiac function. This has allowed us to establish a new transplantation therapy for myocardial infarction and a technique to specifically capture the site of accelerated proliferation at the time of cell transplantation.

研究分野：心筋再生医療

キーワード：心筋再生 細胞移植療法 心筋梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)心筋再生医療について：心疾患は日本で第2位を占める死亡原因となっており（死者数約20万人）、特に心不全は高齢化に伴い、その患者数が増加している。しかしながら、慢性心筋梗塞による心不全など、重症心不全の予後は依然としてきわめて不良であり、心臓移植以外に根本的な治療法は見つかっていない。そこで、心機能を回復させる根本的治療として、再生医療が注目を浴びている。心筋再生医療においては、骨髄細胞などの体性組織幹細胞や、誘導型万能(iPS)細胞をはじめとする多能性幹細胞を利用した移植療法が注目されている。しかし、前者は心機能改善効果が報告間で一致をみず、後者は未分化細胞の残存や遺伝子導入の必要性等、臨床応用への課題が残っている。生理的で安全な治療の開発のために、生体内における内因性的心筋再生促進が重要なアプローチとなる。

従来哺乳類の成体心筋は再生能をもたないと考えられてきたが、近年ヒトを含む哺乳類の心臓でも、増殖能を持つことが示されてきた。しかし、そのソースや頻度については、既存のDNA合成のマーカー(BrdU等)を使った評価モデルでは、厳密に細胞分裂の完了がみれないため、正確な評価ができず、未だに議論の一致をみていない<sup>1</sup>。再生頻度を正確に評価できるモデルを開発したうえで、新規再生促進物質を探索し、さらに治療の開発につなげていくことが求められる。

(2)残存心筋由来の心筋再生の評価について：最近になり、rainbow マウスという、Cre/LoxP システムによる多蛍光発色マウスにより、系譜追跡を可能にするシステムが報告されてきた<sup>2</sup>。そこで、我々はRainbow マウスと $\alpha$ MHC-MerCreMer マウス<sup>3</sup>を交配させて、tamoxifen 投与後に遺伝子組換えが誘導されるレポーターマウスを開発した。このマウスでは、緑色蛍光色素蛋白(EGFP)を発現していた心筋細胞が、3種類の異なる蛍光色素蛋白(mOrange、mCherry、mCerulean)を任意で発現することにより色調を変化させる(図1)。

この蛍光スイッチは心筋特異的であり、非心筋ではおこらない。また隣同士の発色は異なるものになるため、隣接する同色の細胞群が一つの心筋細胞から増殖してできたクローンと考えられる。このマウス(Rainbow-Cre)を用いて、心筋障害や細胞移植など心筋になんらかの刺激が加わった際の、心筋増殖の頻度およびその促進因子について検討できるのではないかと考えた。

(3)BAT 細胞による移植：申請者達は、マウスから採取した褐色脂肪組織(BAT)細胞の一部が、培養環境で刺激伝導系細胞に分化し、その移植により房室ブロックを改善させることを報告した<sup>4</sup>。BAT 細胞には移植細胞として組織との適合性が十分にあり、将来的な自科細胞移植を考える上でも最適な細胞ソースと考えられた。

(4)慢性期心不全への細胞移植療法の確立と心筋再生促進物質同定の応用：慢性期では、長期間において、心筋へ有効作用する治療法が必要になる。我々はマウスの心筋幹細胞の一つである

Sca-1 細胞を PuraMatrixTM scaffold でつつんだ細胞移植をMI 作製時に行うことで、心機能が改善されることを報告した<sup>5</sup>。さらに移植手法を改良することで、MI 作成後1ヶ月の慢性期マウスにおいても、BAT 細胞が生着することを確認している。この手法を上記のRainbow-Cre マウスに適用し、有効性および再生への影響を検証する。さらに心筋の特定部位で増殖がおきているようなら、その部位を採取して、

特異的に発現している心筋再生促進因子の同定につなげるのではないかと考えた。

(1) Am J Physiol Hear Circ Physiol 310:H1045 2016

(2) Proc Natl Acad Sci USA 109:12580 2016

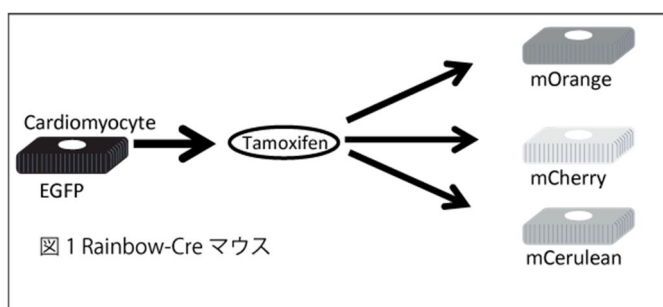
(3) Plos One.11(5):e0156562 2016

(4) Circ J. 79(12):2703 2015

(5) J Mol Cell Cardiol.49(6):972 2010

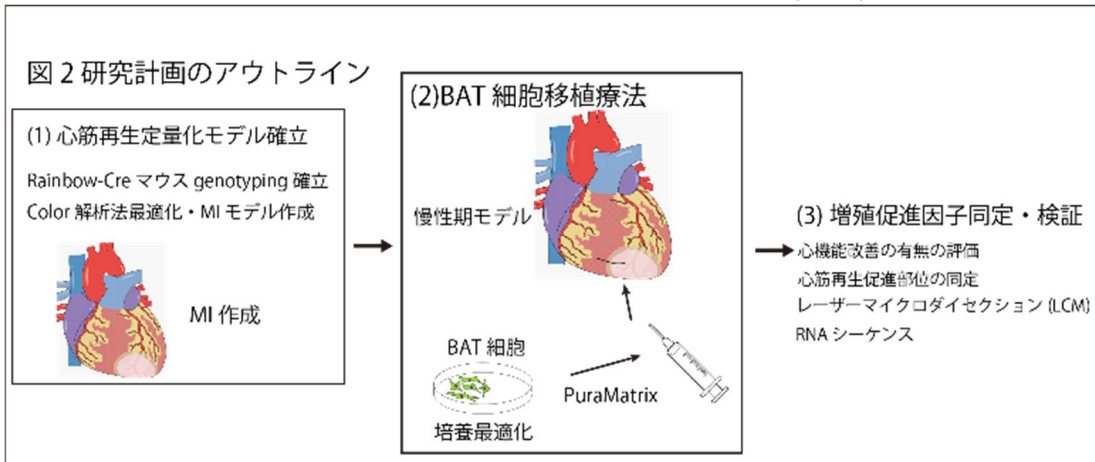
## 2. 研究の目的

本研究はまず心筋特異的多蛍光発色マウスモデル(Rainbow-Cre マウス)を用いて、傷害時に再生の頻度と局在を正確に評価できるモデルを開発する。次に心筋梗塞後の慢性期に対して、バイオマテリアルによる生着性を高めた褐色脂肪組織(BAT)細胞の移植療法の最適化を行う。その移植療法による心筋細胞分裂促進作用を調べ、心筋再生促進因子同定につなげることを目的とした。



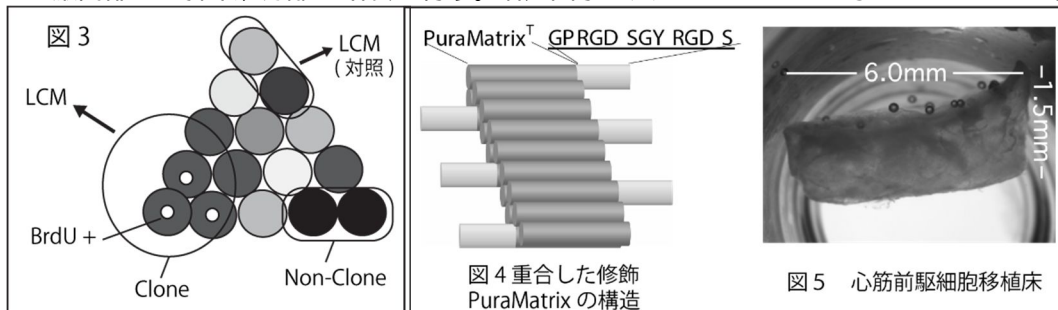
### 3. 研究の方法

心筋増殖を正確に評価する系を確立し、薬剤や移植療法による再生促進作用を評価し、新たな再生促進因子を同定し、治療に応用するために以下の順に施行する(図2)



(1) 心筋再生定量化モデル確立: Rainbow-Cre マウス(Rb/Cre 遺伝子)の尾より抽出した DNA を、設計した primer による定量的 PCR により、Rb/Rb のホモ体を抽出できるようにした。これにより、選別されたホモ体では、tamoxifen 投与後の一細胞内の各相同染色体ごとの蛍光遺伝子の組み合わせにより、6 種の発色パターンを持つため、同色が偶然隣接する可能性が下がる。tamoxifen 投与後、MI 作成群および sham 群の 2 群にわけ、BrdU を毎日投与し、一定期間(28-42 日)後サクリファイスして、color 解析を行う。同一蛍光色の心筋コロニーの形成過程をコロニー数、各コロニー内の心筋細胞数、細胞サイズの時間経過の点から評価する。その際、偶発的な同色隣接の可能性を考慮し、同色 clone 内に一つ以上 BrdU 陽性心筋を含むものをコロニーとして数える(図 3)。MI 群と sham 群での比較により、傷害時の残存心筋による心筋再生を定量化する。

(2) BAT 細胞採取・培養・移植における最適な移植手法の確立: BAT 細胞は、マウスの背部、および腋窩部より採取、分離し培養を行う。増殖因子の入ったメソカルト等とともに 10-14 日培養



し、その後いったん分離し、PuraMatrix とあわせて 3 次元培養を行う。申請者達はすでに、Sca-1 細胞を PuraMatrix<sup>T</sup> M scaffold でつんだ細胞移植が、心筋傷害を改善することを報告した(前述文献 3)。これを改良し、RGD 配列(図 4)を含む機能性ペプチドを結合させた修飾 PuraMatrix<sup>T</sup> M を複合化し、心筋前駆細胞の 3 次元ゲル内長期培養を行う(図 5)。最適化した移植片を MI モデルに投与し、心筋再生の頻度を定量化するまでの過程を確立する。

(3) BAT 細胞移植療法による心機能改善の検証と心筋再生促進の評価: MI を作成した Rainbow-Cre マウスを 4 週間後に再度胸腔を解放して、心筋梗塞ができていないことを確認後、上記の BAT+ PuraMatrix<sup>T</sup> M 移植群と Vehicle 単独移植群にわけ、処置を行う。BrdU を打ち続けた後、4 週間後および 8 週間後に心機能を心エコー・MRI 等で評価の後、サクリファイスする。心筋傷害の程度を組織学的にも評価した後、再生頻度について評価する。BAT 細胞に分裂・増殖促進作用があることがわかったら、分裂・増殖部位を特異的に採取する。心筋コロニーより、レーザーマイクロダイセクション(LCM)を用いて組織を回収する。増殖部位と非増殖部位の細胞群(6 サンプル×2 箇所)を RNA シーケンス等を用いて発現因子比較し、心筋分裂誘導候補因子の選別に近づけていく。

### 4. 研究成果

(1) 心筋再生定量化モデルと評価系の確立: まず遺伝子改変の Rainbow-Cre マウス(Rb/Cre 遺伝子)の Rb/Rb ホモ体を作成し、各蛍光色の心筋の増殖部を観察することで、残存心筋由来の心筋再生探知の方法を確立した。Tamoxifen 投与後にはもともと EGFP であった心筋細胞が mCerulean,

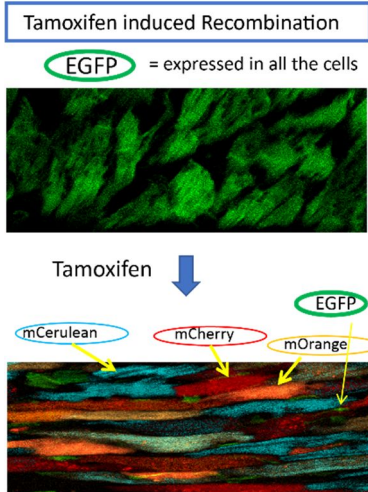
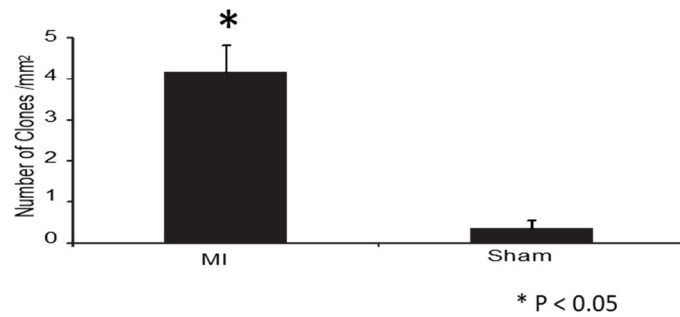


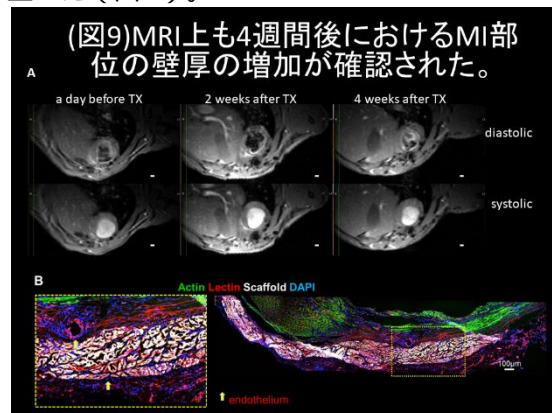
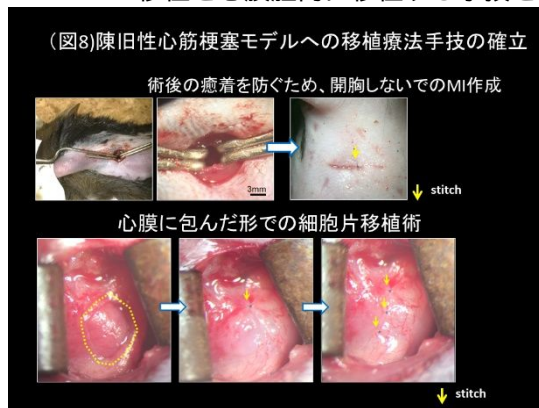
図7 MI42日でのRb/Merマウスにおけるクローン増殖数



mCherry, mOrange がランダムに入り交じった蛍光に変化した。通常は隣同士が違い蛍光になるが、同じ蛍光発色によるクローンが増殖していて、かつ BrdU も取り込まれている部位を観察し、評価した。(図6)

このマウスに、MI を作成し、6 週間後で評価すると MI 群で sham 群に比べ、梗塞周囲領域で再生頻度が増加していることを確認した。またクローンは MI の境界部位において正常部位と比べて、クローンが多い傾向にあることを観察した(図7)。

(2) BAT 細胞移植モデルの確立：次に PuraMatrix<sup>TM</sup> scaffold と併せて 3 次元培養を行い、移植片を作成することに確認した。そして、MI を作成したモデルマウスを 2-4 週間後に上記の BAT+ PuraMatrix 移植を心膜腔内に移植する手技を確立した(図8)。



(3) BAT 細胞移植療法による心機能改善と今後について：本移植療法によりこれまでの単に細胞移植による方法と異なり、移植後 4-8 週後も細胞が残存することを確認した。また MRI 上も 4 週間後における MI 部位の壁厚保の増加が確認された(図9)。心エコー・MRI による評価では細胞移植群で、コントロール群に比較して、収縮率(FS)の改善傾向および左室拡張末期径の拡大抑制が認められた。

これらの Rb-Cre マウスへの BAT 細胞移植療法から心機能評価、再生部位の同定まで一連の手技を安定して行えるようにあった。これらにより、心筋梗塞に対して、あたらしい移植療法を確立できたと同時に、細胞移植時に増殖促進部位を特異的に捕らえる手技を確立できた。コロナ禍の影響もあり、研究の進捗に影響が出た時期もあったが、今後、増殖部位の同定と同部位からのサンプル収集、発現因子を解析して、新規心筋再生促進因子の解明につながる結果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 神田 真人
2. 発表標題 Pulmonary Pressure Overload Stimulates Cardiac Stem Cell or Progenitor Cell-derived Cardiac Regeneration in the Right Ventricular Area
3. 学会等名 ESC Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 真人
2. 発表標題 A Novel Multicolor Lineage Tracing Model can Detect Cardiomyocyte-derived Cardiac Regeneration after Injury
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田 真人
2. 発表標題 Endogenous Cardiomyocyte-derived Cardiac Regeneration Occurs Slowly after Myocardial Infarction and Continues into the Late Phase: Multicolor Lineage Tracing Mice Model
3. 学会等名 ESC Congress2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神田 真人
2. 発表標題 Pulmonary pressure overload stimulates cardiac stem cell or progenitor cell proliferation leading to area-biased cardiac regeneration
3. 学会等名 ESC Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田 真人
2. 発表標題 Pulmonary Pressure Overload stimulates Stem-Cell Derived- Endogenous Cardiomyocyte Regeneration in Right Ventricle
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永井 敏雄  (Nagai Toshio)  (00334194)	国際医療福祉大学・医学部 循環器内科・教授   (32206)	
研究協力者	近藤 尚通  (Kondo Naomichi)  (70797000)	千葉大学医学部附属病院・循環器内科・医員   (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------